



Programme
des Nations Unies
pour l'environnement



UNEP/WG.144/Inf.6
15 mai 1986

FRANCAIS
Original: ANGLAIS

PLAN D'ACTION POUR LA MEDITERRANEE

Quatrième réunion du Groupe de travail
sur la coopération scientifique et
technique pour le programme MED POL

Athènes, 16-20 juin 1986

EXAMEN DES EXERCICES D'INTERETALONNAGE SUR LES METHODES
MICROBIOLOGIQUES POUR LA SURVEILLANCE CONTINUE
DE LA QUALITE DES EAUX COTIERES

En coopération avec



OMS

PNUE
Athènes, 1986

TABLE DES MATIERES

Introduction	1
Objectifs	3
Exercices d'interétalonnage	4
Méthodes microbiologiques	7
Interprétation statistique	10
Résultats et discussion	12
Exercice d'interétalonnage de Rome	12
Exercice interlaboratoire	13
Rapports des laboratoires participants	14
Exercice d'interétalonnage en commun	18
Exercice d'interétalonnage de Barcelone	20
Exercice d'interétalonnage d'Athènes	22
Exercice d'interétalonnage de Tunis	24
Exercice d'interétalonnage de Split	26
Exercice d'interétalonnage de Marseille	28
Détermination des streptocoques fécaux	30
Conclusions	32
Recommandations	35
Références	37

INTRODUCTION

La phase pilote du Programme coordonné de surveillance et de recherche sur la pollution dans la Méditerranée MED POL Phase II, a été approuvée en 1975 par 16 états riverains de la Méditerranée comme étant la composante scientifique et technique du Plan d'Action.

Parmi les objectifs spécifiques du MED POL Phase I, on peut signaler les deux suivants: 1) formuler et mener à bien un programme coordonné de surveillance et de recherche et 2) aider les centres de recherche nationaux à développer leur capacité de participation au programme (PNUE, 1983a).

Un des sept projets pilotes initialement considérés dans le MED POL Phase I a été le Projet MED POL VII, intitulé Contrôle de la qualité des eaux côtières, coordonné en commun par le PNUE et l'OMS. L'objectif général de ce projet a été d'obtenir des données statistiquement significatives, une information scientifique et des principes techniques nécessaires pour évaluer les niveaux actuels de la pollution côtière en ce qui concerne la santé humaine.

Les résultats recueillis par les centres nationaux participant au Projet MED POL VII ont permis une évaluation de l'état de la pollution microbienne des eaux côtières de la Méditerranée, et ont en même temps mis en évidence la nécessité d'assurer la fiabilité et la comparabilité des données microbiologiques recueillies par les centres nationaux. La nécessité d'un programme de contrôle de qualité et d'interétalonnage a été l'une des conclusions les plus importantes du Projet MED POL VII.

En 1979, après examen de l'état d'avancement des travaux menés à bien par les centres Méditerranéens en collaboration avec des organisations des Nations Unies, les Parties contractantes ont recommandé qu'un programme à long terme de surveillance et de recherche sur la pollution devrait être formulé par le PNUE, en tant que Secrétariat pour la Convention de Barcelone. Un programme sur 10 ans a été formulé par le PNUE, en collaboration avec les organisations engagées dans le MED POL Phase I, et approuvé par les Parties contractantes en 1981, sous le nom de MED POL Phase II (PNUE, 1983b).

L'objectif général à long terme du MED POL Phase II a été de faire avancer les objectifs de la Convention de Barcelone par l'aide aux Parties contractantes afin de prévenir, réduire et combattre la pollution de la mer Méditerranée, ainsi que pour protéger et développer l'environnement marin de la Région.

En accord avec l'Article 10 de la Convention de Barcelone et les protocoles qui s'y réfèrent, un des objectifs spécifiques du MED POL Phase II est d'établir des programmes complémentaires ou communs de surveillance continue de la pollution dans la zone de la mer Méditerranée ainsi que d'instaurer dans cette zone un système de surveillance de la pollution (NU, 1978).

Afin de satisfaire les principes de base considérés dans son développement, le MED POL Phase II spécifie que l'échantillonnage et les techniques analytiques utilisés pour la surveillance continue seront fondés sur des méthodes de référence obligatoires, et que tous les centres de recherche nationaux participeront à l'interétalonnage permanent des techniques d'échantillonnage et d'analyse ou aux programmes de contrôle de qualité des données (PNUE, 1983b).

Par ailleurs, le MED POL Phase II inclut une composante d'assistance selon laquelle un programme de contrôle de qualité sera une partie intégrante du MED POL Phase II, afin d'assurer le meilleur degré possible de qualité et de comparabilité des données. Des points faibles découverts à travers le programme de contrôle de qualité seront corrigés par une formation et une assistance technique supplémentaires, quand cela s'avérera nécessaire.

C'est dans ce contexte qu'une série de 6 exercices d'interétalonnage sur les méthodes microbiologiques pour la surveillance continue de la qualité des eaux côtières a été menée à bien dans la Méditerranée, entre 1982 et 1985, sous la coordination commune du PNUE et de l'OMS, et la collaboration des centres de recherche méditerranéens.

Le nombre considérable de résultats expérimentaux obtenus, et l'importance des conclusions auxquelles on est arrivé pendant les sessions techniques de ces exercices d'interétalonnage, devraient être d'une grande utilité pour l'avancement de la composante microbiologique du programme de surveillance continue qui est mené à bien par les pays méditerranéens, et en conséquence mérite un examen et une évaluation détaillés.

OBJECTIFS

L'objectif principal de cette étude est d'examiner et d'évaluer les résultats expérimentaux obtenus ainsi que les conclusions atteintes pendant la série de six exercices d'interétalonnage sur les méthodes microbiologiques pour la surveillance continue de la qualité des eaux côtières, menée à bien dans la région méditerranéenne de 1982 à 1985.

Les objectifs spécifiques de cette étude sont les suivants :

1. Discuter les difficultés pratiques rencontrées pendant la réalisation des exercices d'interétalonnage, en particulier celles qui concernent la préparation et l'analyse des échantillons d'eau de mer dont on ignore les concentrations microbiennes.
2. Identifier les phases analytiques qui doivent être davantage spécifiées et normalisées, afin d'assurer qu'elles n'introduisent pas de variations significatives dans l'analyse microbiologique des eaux côtières.
3. Déterminer le degré et les facteurs qui influent sur la précision de la méthode de filtration sur membrane et de la méthode des tubes multiples quand on analyse la qualité microbiologique des eaux côtières.
4. Examiner l'influence que les milieux de culture et les conditions d'incubation exercent sur les résultats des analyses microbiologiques des eaux côtières.
5. Evaluer le degré de comparabilité des résultats obtenus par la méthode de filtration sur membrane et la méthode des tubes multiples lors de l'analyse de la qualité microbiologique des eaux côtières.
6. Discuter l'intérêt pratique de l'emploi des méthodes statistiques proposées au moment de l'interprétation des résultats microbiologiques des exercices d'interétalonnage.
7. Recommander des alternatives qui permettent de poursuivre les exercices d'interétalonnage et le programme de contrôle de qualité envisagé dans le MED POL Phase II.

EXERCICES D'INTERÉTALONNAGE

Six exercices d'interétalonnage sur les méthodes microbiologiques pour la surveillance continue de la qualité des eaux côtières ont été organisés dans la région méditerranéenne coordonnés en commun par le PNUE et l'OMS. Bien que le premier exercice, qui s'est tenu à Rome en novembre 1982, soit considéré tant un résumé critique du travail réalisé pendant le MED POL Phase I qu'une activité préliminaire aux cinq exercices prévus dans le cadre du MED POL Phase II, le nombre considérable de résultats obtenus ainsi que l'intérêt des conclusions atteintes pendant l'exercice d'interétalonnage de Rome ont conseillé son inclusion dans cette étude.

La table 1 montre la liste des institutions méditerranéennes responsables de l'organisation de chaque exercice d'interétalonnage, ainsi que leurs dates et les langues de travail utilisées.

Les nationalités et le nombre de participants à la série d'exercices d'interétalonnage figurent sur la table 2. Le nombre moyen de participants à chaque exercice d'interétalonnage a été de 25; entre 30 et 80% des participants venaient du pays accueillant l'exercice. Au total, 148 scientifiques ont participé aux six exercices d'interétalonnage: 137 en provenance de la région méditerranéenne et 9 d'autres régions du monde.

Table 1. Exercices d'interétalonnage sur des méthodes microbiologiques pour la surveillance continue de la qualité des eaux côtières qui se sont tenus dans la région méditerranéenne sous la coordination en commun du PNUE et de l'OMS.

Institution organisatrice	Dates	Langues de travail
Istituto Superiore di Sanità. Rome, Italie.	22-26 Septembre 1982	Anglais et Français
Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Caminos, Canales y Puertos. Barcelone, Espagne	7-11 Novembre 1983	Français
Environmental Pollution Control Project. Athènes, Grèce.	25-29 Juin 1984	Anglais
Institut Pasteur de Tunis Tunis, Tunisie.	12-16 Novembre 1984	Français
Institute of Oceanography and Fisheries. Split, Yougoslavie.	15-20 Avril 1985	Anglais
Laboratoire Départemental de Santé Publique. Marseille, France.	18-13 Novembre 1985	Français et Anglais

Table 2. Participants aux exercices d'interétalonnage sur des méthodes microbiologiques pour la surveillance continue de la qualité des eaux côtières qui se sont tenus dans la région méditerranéenne sous la coordination en commun du PNUE et de l'OMS.

Pays du Participant	Nombre des participants à l'exercice de						Nombre total de participants
	Rome	Barcelona	Athènes	Tunis	Split	Marseille	
Algérie	-	1	-	-	-	1	2
Chypre	-	-	1	-	1	-	2
Egypte	1	-	-	-	-	1	2
Espagne	3	22	-	-	-	1	26
France	3	1	-	2	-	16	22
Grèce	1	-	19	-	-	1	21
Israël	2	-	2	-	1	1	6
Italie	8	-	-	2	-	-	10
Liban	-	-	-	-	1	-	1
Libye	-	-	-	-	1	-	1
Malte	1	-	1	-	-	1	3
Monaco	-	1	-	-	-	-	1
Maroc	1	-	-	4	-	1	6
Tunisie	1	1	-	14	-	1	17
Turquie	-	-	1	-	2	-	3
Yugoslavie	2	-	2	2	9	1	16
Autres	5	2	-	2	-	-	9
Total	28	28	26	26	15	25	148

METHODES MICROBIOLOGIQUES

L'objectif fondamental de cette série d'exercices d'interétalonnage sur les méthodes microbiologiques pour la surveillance continue de la qualité des eaux côtières était de permettre aux participants d'effectuer des déterminations bactériologiques sur des échantillons identiques d'eau de mer et de bivalves, en utilisant les Méthodes de Référence élaborées en commun par le PNUE et l'OMS. De plus, les exercices avaient pour objectif d'obtenir davantage d'information sur la comparabilité de la méthode de filtration sur membrane avec la méthode des tubes multiples pour la détermination des coliformes totaux, des coliformes fécaux et des streptocoques fécaux sur des échantillons d'eau de mer.

Les connaissances et l'expérience obtenues par les scientifiques méditerranéens, tant au cours des activités de surveillance continue de routine que lors de leur participation à cette série d'exercices d'interétalonnage, ont donné lieu à une révision et à une mise à jour continues des Méthodes de Référence pour la détermination des indicateurs microbiens par la méthode de filtration sur membrane, dont les modifications les plus importantes seront examinées dans cette étude.

Puisque les Méthodes de Référence pour la détermination des indicateurs microbiens par la méthode des tubes multiples n'étaient pas disponibles au début de la série d'exercices d'interétalonnage, il a été nécessaire de mener à bien la plupart des déterminations microbiennes au moyen de méthodologies provisoires de cette méthode analytique.

Afin d'identifier les activités réellement réalisées et les méthodes analytiques adoptées pendant chaque exercice d'interétalonnage, les types et le nombre d'analyses effectuées ainsi que les milieux de culture et les conditions d'incubation utilisés dans chaque exercice ont été résumés dans la table 3.

Comme la table 3 l'indique, les exercices d'interétalonnage qui se sont tenus à Rome et à Barcelone ont été consacrés à la détermination des indicateurs fécaux dans l'eau de mer par la méthode de filtration sur membrane. La véritable comparaison entre la méthode de filtration sur membrane et la méthode des tubes multiples a été effectuée essentiellement au cours des exercices qui se sont tenus à Athènes, à Tunis et à Marseille. Les résultats obtenus lors de l'exercice qui s'est tenu à Split ont seulement permis l'interétalonnage de la méthode de filtration sur membrane.

A part quelques légères modifications dans les méthodes analytiques utilisées pendant les exercices d'interétalonnage, la modification la plus significative quant aux milieux de culture a été celle relative aux streptocoques fécaux: tandis que la gélose KF'Streptococcus avait été le milieu de culture adopté pendant les trois premiers exercices, la gélose M-Enterococcus a été le milieu de culture choisi lors des trois derniers exercices. Les raisons de ce changement seront examinées dans une section ultérieure de cette étude.

Table 3. Analyses effectuées et méthodes analytiques adoptées au cours des exercices d'interétalonnage sur des méthodes microbiologiques pour la surveillance continue de la qualité des eaux côtières qui se sont tenus dans la région méditerranéenne sous la coordination en commun du PNUE et de l'OMS.

Exercice d'interétalonnage	Type d'indicateur	Type d'échantillon	Méthode analytique	Milieux de culture	
				FM	NPP
Rome	CF	3 d'eau de mer	FM	Gélose M-FC 44°C	-
	SF	3 d'eau de mer	FM	Gélose KF-Streptococcus 36°C	-
Barcelona	CT	9 d'eau de mer	FM	Gélose M-Endo 37°C	-
	CF	9 d'eau de mer	FM	Gélose M-FC 44,5°C	-
	SF	9 d'eau de mer	FM	Gélose KF-Streptococcus 37°C	-
Athènes	CT	2 d'eau de mer	NPP	-	Bouillon lactosé 36°C Bouillon BGB 44°C
	CF	2 d'eau de mer	FM/NPP	Gélose M-FC 44,5°C	Bouillon lactosé 36°C Milieu EC 44 °C Indole 44 °C
	SF	2 d'eau de mer	FM/NPP	Gélose KF-Streptococcus 36°C	Bouillon azide dextrose 36°C Bouillon EVA 36°C

(suite à la page suivante)

Table 3 (suite)

Tunis	CT	3 d'eau de mer	FM/NPP	Gélose M-Endo 37°C	Bouillon lactosé 37°C
	CF	3 d'eau de mer	FM/NPP	Gélose M-FC 44°C	Bouillon lactosé 37°C Bouillon BGB 44°C Indole 44°C
	SF	3 d'eau de mer	FM/NPP	Gélose M-Enté-rococcus 37°C	Bouillon de Rothe 37°C Bouillon de Litsky 37°C
	CF	1 de coquillages	NPP	-	Bouillon lactosé 37°C Bouillon BGB 44°C Indole 44°C
Split	CT	3 d'eau de mer	FM	Gélose M-Endo 36°C	-
	CF	3 d'eau de mer	FM/NPP	Gélose M-FC 44,5°C	Bouillon lactosé 36°C Bouillon de MacConkey 44,5°C Indole 44,5°C
	SF	3 d'eau de mer	FM	Gélose M-Enté-rococcus 36°C	-
	CF	1 de coquillages	NPP	-	Bouillon lactosé 37°C Bouillon de MacConkey 44,5°C Indole 44,5°C
Marseille	CF	2 d'eau de mer	FM/NPP	Gélose M-FC 44 °C	A-1 44°C Indole 44°C
	SF	2 d'eau de mer	FM/NPP	Gélose M-Enté-rococcus 36°C	Bouillon de Rothe 37°C Bouillon de Litsky 37°C
	CF	1 de coquillages	NPP	-	Bouillon lactosé 37°C Bouillon BGB 44,5°C Indole 44,5°C

INTERPRETATION STATISTIQUE

Les résultats expérimentaux des six exercices d'interétalonnage ont été analysés et interprétés au moyen de méthodes statistiques appropriées.

Les concentrations microbiennes obtenues par différents analystes, lors de l'utilisation de la même méthode analytique sur des échantillons identiques, ont été évaluées au moyen d'une distribution de probabilité normale logarithmique. Il est bien connu que les logarithmes des concentrations microbiennes obtenues par des analyses répétées sur des échantillons identiques suivent une distribution de probabilité normale, et par conséquent il est possible de les interpréter par des techniques statistiques habituelles.

Une distribution de probabilité normale logarithmique peut être complètement définie par sa moyenne et par son écart type.

La valeur moyenne d'une distribution normale logarithmique donne une estimation de la tendance centrale des résultats expérimentaux. Dans le cas particulier d'analyses microbiologiques répétées, la valeur moyenne de la distribution normale logarithmique donne la meilleure estimation de la concentration microbienne de l'échantillon analysé. La moyenne géométrique des concentrations microbiennes est équivalente à la moyenne de la distribution normale logarithmique.

L'écart type d'une distribution normale logarithmique donne une estimation du degré de dispersion des résultats expérimentaux en relation avec leur valeur moyenne. Dans le cas particulier des analyses microbiologiques répétées, l'écart type de la distribution normale logarithmique est la meilleure estimation de la précision de la méthode analytique utilisée pour déterminer la concentration microbienne de l'échantillon analysé.

Le degré de précision d'une série de déterminations répétées est habituellement exprimé par un intervalle de confiance des valeurs expérimentales. L'intervalle de confiance à 95% est le plus fréquemment utilisé; comme son nom l'indique, l'intervalle de confiance à 95% représente l'étendue des valeurs expérimentales qui contiendraient, en moyenne, 95% des résultats inclus dans un nombre illimité de groupes de données, chacun d'entre eux contenant un nombre considérable de valeurs expérimentales. Plus l'intervalle de confiance à 95% des déterminations expérimentales est petit, plus la méthode analytique est précise.

L'intervalle de confiance à 95% d'une distribution normale logarithmique peut être estimé en additionnant et en soustrayant 1,96 fois l'écart type de la valeur moyenne. Les calculs doivent être effectués avec les données exprimées en logarithmes. Pour obtenir les valeurs extrêmes de l'intervalle de confiance des concentrations microbiennes, il faut calculer l'antilogarithme des valeurs estimées précédemment.

A cet égard, il faut signaler que l'intervalle de confiance à 95% pour les données exprimées en logarithmes serait défini par la valeur moyenne logarithmique, augmentée ou diminuée de 1,96 fois l'écart type de la distribution normale logarithmique. L'intervalle de confiance à 95% correspondant aux données microbiennes initiales serait défini par l'antilogarithme de la valeur moyenne, multiplié ou divisé par l'antilogarithme de 1,96 fois l'écart type de la distribution normale logarithmique.

La méthode statistique utilisée pour calculer la moyenne et l'écart type des séries de déterminations répétées obtenues lors des exercices d'interétalonnage a été celle décrite dans l'annexe 3 du rapport final de l'exercice d'interétalonnage qui s'est tenu à Barcelone (OMS/PNUE, 1985a).

La méthode statistique mentionnée ci-dessus est fondée sur une estimation graphique de la distribution normale logarithmique associée à une série de concentrations microbiennes expérimentales, par l'interpolation d'une ligne droite aux valeurs expérimentales dessinées sur un papier de probabilité normale. L'interpolation permet le rejet des lectures aberrantes, sur la base de critères statistiques.

Cette méthode statistique a été incorporée dans la Méthode de Référence pour l'évaluation et l'interprétation des données de la surveillance microbiologique continue des eaux de plaisance côtières et des zones d'élevage de bivalves qui sera publiée dans les prochains mois sous la coordination en commun de l'OMS et du PNUE.

Enfin, la comparaison des résultats expérimentaux obtenus par différentes méthodes microbiologiques a été effectuée avec des méthodes statistiques habituelles de vérification d'hypothèses (Gibra, 1973), sur la base des paramètres statistiques estimés précédemment.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

Pendant la mise en oeuvre du Projet MED POL VII, les chercheurs principaux de 30 laboratoires méditerranéens avaient recommandé qu'une inter-comparaison des méthodes analytiques pour la détermination des indicateurs microbiens soit menée à bien au niveau régional de la Méditerranée, afin d'assurer la comparabilité des résultats (OMS/PNUE, 1981). Cependant, une intercomparaison détaillée de la méthode de filtration sur membrane et de la méthode des tubes multiples n'a pas pu être terminée au cours du MED POL Phase I, qui s'est achevé en 1981.

Simultanément, on préparait les premières Méthodes de Référence pour la détermination des indicateurs microbiens sous la coordination en commun du PNUE et de l'OMS. En 1982, quatre Méthodes de Référence étaient disponibles, qui couvraient la détermination des coliformes totaux, des coliformes fécaux et des streptocoques fécaux dans l'eau de mer, par la méthode de filtration sur membrane, et la détermination des coliformes fécaux dans les bivalves par la méthode des tubes multiples. Ces Méthodes de Référence étaient les premières à être préparées en accord avec dispositions du MED POL Phase II en ce qui concerne les techniques d'échantillonnage et d'analyse.

EXERCICE D'INTERETALONNAGE DE ROME

Au début de 1982, le PNUE et l'OMS ont demandé à un certain nombre de laboratoires méditerranéens d'évaluer les quatre Méthodes de Référence disponibles, dans leurs conditions ambiantales locales, et de mener à bien un exercice d'intercomparaison entre laboratoires de la méthode de filtration sur membrane et de la méthode des tubes multiples pour la surveillance continue de la qualité microbiologique des eaux côtières.

Les résultats de ces activités devaient être évalués par l'Istituto Superiore di Sanità de Rome, lors d'une réunion de consultation qui s'est tenue le 22 et 23 novembre 1982. La réunion de consultation serait suivie du 24 au 26 novembre 1982, par un exercice d'interétalonnage en commun des Méthodes de Référence proposées, au moyen des analyses effectuées par les participants sur des échantillons identiques d'eau de mer, dans les laboratoires de l'Istituto Superiore di Sanità de Rome.

Les séances techniques organisées par l'Istituto Superiore di Sanità de Rome représentent par conséquent deux formes différentes d'aborder l'intercomparaison des méthodes microbiologiques: tandis que la première séance marque la culmination des travaux initiés par les laboratoires méditerranéens au cours du Projet MED POL VII, où chaque laboratoire avait évalué indépendamment les deux méthodes analytiques, la deuxième séance représente les débuts de l'approche qui serait adoptée dans la série d'exercices d'interétalonnage, pendant lesquels les microbiologistes des différents laboratoires devraient analyser des échantillons

identiques, en utilisant les deux méthodes analytiques, dans les mêmes conditions expérimentales.

Il est donc pertinent d'examiner séparément le travail effectué au cours des deux séances techniques qui se sont tenues à l'Istituto Superiore di Sanità de Rome.

Exercice Interlaboratoire

Bien que l'analyse comparative de la méthode de filtration sur membrane et de la méthode des tubes multiples ait englobé un grand nombre d'aspects, les différences entre les contributions et les méthodologies adoptées par les cinq laboratoires participants ont rendu le processus de synthèse et de comparabilité assez difficile (OMS/PNUE, 1983).

Néanmoins, une analyse statistique des résultats présentés par les laboratoires participants a permis de formuler les conclusions suivantes:

1. En général, une corrélation très significative a été trouvée entre les résultats obtenus par la méthode des tubes multiples et ceux obtenus par la méthode de filtration sur membrane, lorsque l'on considère le même paramètre et le même échantillon d'eau de mer.
2. Il a été observé que la variabilité de la contamination parmi les différents points de prélèvement pouvait atteindre un maximum de trois ordres de grandeur dans certains cas. Une variabilité d'un à deux ordres de grandeur était très fréquente.
3. Les concentrations microbiennes obtenues par la méthode de filtration sur membrane et la méthode des tubes multiples montrent une corrélation très significative quand les valeurs sont supérieures à 10 CF/100 ml.
4. Bien que des variations systématiques du niveau de contamination puissent être détectées de façon convenable par les deux méthodes d'analyse dans l'intervalle 1-100 CF/100 ml, l'accord entre les résultats correspondants est restreint lorsque l'on considère de petites variations.
5. Des sites contaminés et non-contaminés peuvent être distingués et classifiés de façon pertinente par les deux méthodes d'analyse, pourvu que l'on dispose d'un nombre suffisant de déterminations analytiques, puisqu'un seul résultat n'a pas de signification à cet effet.
6. Les différences entre les deux méthodes paraissent être négligeables en général. Cependant, la question de savoir quelle est la méthode la plus fiable peut se poser lorsque des études spécifiques sont nécessaires, telle que l'évaluation des sites qui se trouvent dans la limite d'acceptabilité bactériologique.

Rapports des Laboratoires Participants

En plus des données de base utilisées pour l'exercice interlaboratoire, les rapports présentés par sept laboratoires méditerranéens contiennent quelques unes des études les plus détaillées et les plus illustratives sur les aspects méthodologiques qui régissent l'évaluation de la qualité microbiologique des eaux côtières. En résumé, ces études peuvent être considérées comme une excellente synthèse du travail scientifique initié dans la région méditerranéenne durant le Projet MED POL VII.

Les résultats et les discussions contenus dans ces sept rapports mettent clairement en évidence deux faits: 1) la détermination analytique des indicateurs microbiens doit être étudiée et développée davantage, afin d'assurer que les résultats expérimentaux reflètent convenablement les concentrations microbiennes présentes dans les échantillons, et 2) la détermination analytique des indicateurs microbiens doit être normalisée et soumise à un programme continu de contrôle de qualité, afin d'assurer que les résultats obtenus par différents analystes soient fiables et comparables.

Bien que la simplicité de leur détermination analytique et la présence si répandue des indicateurs microbiens puisse amener à croire qu'ils peuvent être mesurés de manière fiable par des méthodes bien établies, sans avoir besoin d'un programme continu de contrôle de qualité, le travail expérimental mené à bien par ces laboratoires méditerranéens montre clairement le caractère erroné de ces deux opinions fréquentes.

Compte tenu de l'intérêt et de l'importance de ces études expérimentales pour l'interprétation des résultats de la série d'exercices d'interétabilité qui a été menée à bien par la suite, les conclusions les plus importantes de ces études ont été résumées comme suit:

1. Une étude comparative, menée à bien par El-Sharkawi et collaborateurs (OMS/PNUÉ, 1983), de la méthode des tubes multiples, de la méthode LES de filtration sur membrane et de la méthode de filtration sur membrane avec double couche de milieu montre que la méthode des tubes multiples donne les dénombrements les plus petits en comparaison avec les deux autres méthodes.

La méthode LES s'est avérée meilleure et plus précise pour la détermination des coliformes fécaux que la méthode de double couche. La plus grande efficacité de la méthode LES peut être attribuée à la période de récupération plus longue sur le milieu de culture riche et non-sélectif qui contient des hydrates de carbone simples. Bien que la méthode LES ait fourni des dénombrements plus élevés, elle a requis une incubation sur deux milieux différents pendant deux jours avant d'obtenir les résultats finaux.

La méthode de double couche de gélose fournit un dénombrement bactérien direct et exact, ne requiert que 24 heures pour être terminée et possède l'avantage d'économiser des milieux, des tubes, des porte-tubes et de la place.

En résumé, la méthode de filtration sur membrane fournit les résultats les plus convenables, la méthode LES donne le dénombrement le plus élevé de coliformes fécaux, tandis que la méthode de la double couche économise du temps, des milieux et du travail.

2. Dans une étude comparative de la méthode de filtration sur membrane et de la méthode des tubes multiples, Bernard (OMS/PNUE, 1983) rapporte que les concentrations de coliformes fécaux et de streptocoques fécaux obtenues par les deux méthodes sont équivalentes, à l'exception des analyses des eaux portuaires. De plus, l'intervalle de confiance obtenu pour les deux indicateurs microbiens est plus grand lorsque l'on utilise la méthode des tubes multiples que lorsque l'on utilise la méthode de filtration sur membrane.
3. Dans cette étude comparative sur la récupération des indicateurs microbiens dans les eaux de mer, menée à bien par Yoshpe-Puver (OMS/PNUE, 1983), la phase de ressuscitation que comporte la méthode de la gélose en double couche permet de récupérer un nombre plus grand de coliformes fécaux uniquement dans quelques échantillons. Ce résultat a amené à conclure que l'utilisation de la méthode de la gélose en double couche ne serait pas justifiée, en particulier sur des plages propres, en raison de la quantité de temps et de travail qu'elle demande.

Cette étude a mis également en évidence que les dénombrements de streptocoques fécaux étaient bien supérieurs à une température d'incubation de 35° qu'à une température de 44,5° et qu'ils augmenteraient significativement avec une période de ressuscitation de 2 à 2,5 heures. Dans 90% des échantillons, les dénombrements de streptocoques fécaux fournis par la méthode de filtration sur membrane à 35° étaient significativement supérieurs à ceux fournis par la méthode des tubes multiples.

Il n'a pas été possible d'offrir une explication à l'énorme différence existant entre le degré de récupération des streptocoques fécaux par la méthode de filtration sur membrane avec la gélose KF et par la méthode des tubes multiples. Cependant, parmi les colonies qui avaient été confirmées, entre 10 et 30% n'étaient pas des streptocoques, mettant en évidence le caractère sélectif et restreint de la gélose KF.

Puisque le milieu PSE a l'avantage d'une période d'incubation encore plus courte, et que plusieurs auteurs ont montré qu'il était plus sélectif dans certains environnements, il peut être intéressant de comparer les deux milieux afin de sélectionner le mieux adapté aux eaux de la Méditerranée.

4. Dans une comparaison des méthodes microbiologiques pour la surveillance continue des indicateurs microbiens de l'eau de mer et du sable, menée à bien par Vila et collaborateurs (OMS/PNUE, 1983), une corrélation très significative a été trouvée

entre les dénombrements des coliformes fécaux obtenus par la méthode de filtration sur membrane et ceux obtenus par la méthode des tubes multiples. Les deux concentrations semblent être essentiellement équivalentes, bien que les résultats de la filtration sur membrane soient sensiblement inférieurs à ceux obtenus par la méthode des tubes multiples, en particulier lorsque les niveaux de contamination sont bas.

Les logarithmes des valeurs initiales ont été pris en considération, parce que cette transformation permet d'obtenir une distribution statistique similaire à celle de Gauss, simplifiant ainsi le traitement statistique des données.

Toutes les données obtenues indiquent que les concentrations de coliformes totaux, de coliformes fécaux et de streptocoques fécaux dans les échantillons d'eau de mer et de sable sont généralement en corrélation. Les résultats obtenus permettent une classification facile de la contamination des sites, lorsque l'on tient compte de plusieurs valeurs et la concentration microbienne moyenne apparaît comme le meilleur indicateur de qualité. Une seule valeur est rarement significative à cet effet.

La reproductibilité des déterminations microbiennes, vérifiée par des analyses répétées des mêmes échantillons, semble être caractérisée par un écart type logarithmique (logarithmes naturels) entre 0,7 et 0,8 approximativement, ce qui correspond à un facteur de 2 pour les données initiales dans le cas des coliformes totaux et des coliformes fécaux et légèrement meilleur pour les streptocoques fécaux.

5. Dans une étude comparative des méthodologies analytiques pour l'analyse microbiologique de l'eau de mer, menée à bien par Feliú et collaborateurs (OMS/PNUE, 1983), les dénombrements des coliformes totaux, des coliformes fécaux et des streptocoques fécaux obtenus par la méthode de filtration sur membrane n'ont pas été significativement différents de ceux obtenus par la méthode des tubes multiples, à l'exception des concentrations plus faibles de coliformes totaux, où les valeurs obtenues par la méthode de filtration sur membrane étaient supérieures à celles obtenues par la méthode des tubes multiples.

Les concentrations de coliformes totaux et de coliformes fécaux obtenues par la méthode de filtration sur membrane utilisant des tampons absorbants ou de la gélose ne présentent pas de différences significatives à l'exception des concentrations plus faibles de coliformes totaux, où l'utilisation des tampons absorbants donne des résultats légèrement supérieurs à ceux obtenus avec l'utilisation de la gélose.

Dans les conditions économiques qui prévalent dans le laboratoire qui a réalisé cette étude, le coût moyen du matériel et de l'équipement nécessaires à l'analyse d'un indicateur microbien est légèrement supérieur pour la méthode des tubes multi-

ples que pour la méthode de filtration sur membrane. D'autre part, le temps nécessaire pour que le personnel effectue une analyse microbiologique par la méthode des tubes multiples est à peu près le double de celui requis par la méthode de filtration sur membrane.

6. Dans une étude comparative des méthodes analytiques pour la surveillance microbiologique des eaux côtières et des sédiments, menée à bien par Jekov et collaborateurs (OMS/PNUE, 1983), la détermination des coliformes totaux et des coliformes fécaux a été effectuée par la méthode des tubes multiples utilisant trois milieux de culture alternatifs: le bouillon de MacConkey, le bouillon lactosé et le bouillon vert brillant bilié.

Les résultats obtenus montrent clairement que le bouillon lactosé a une capacité supérieure à celle des deux autres bouillons contenant du lactose pour déterminer le degré de pollution d'un échantillon d'eau, en termes de coliformes totaux et de coliformes fécaux.

Le bouillon lactosé semble offrir des conditions appropriées pour la récupération des bactéries coliformes en stress, tandis que des bouillons sélectifs, tels que le bouillon de MacConkey ou le bouillon au vert brillant bilié, semblent présenter des difficultés additionnelles pour la croissance et la prolifération de ces microbes et empêchent par là leur détection dans le laboratoire.

En résumé, la méthode des tubes multiples semble être supérieure à la méthode de filtration sur membrane pour déterminer le degré de pollution de l'eau, indépendamment du type de bouillon lactosé utilisé. Cependant, l'étude met en évidence que le nombre d'échantillons considéré dans ce cas a été trop petit pour permettre d'établir une conclusion statistique valable concernant la supériorité de la méthode des tubes multiples sur la méthode de filtration sur membrane.

7. Dans une contribution à l'étude comparative des méthodes analytiques pour détecter les indicateurs microbiens, Fucks (OMS/PNUE, 1983) indique quelques désaccords entre les résultats obtenus avec la méthode de filtration sur membrane et ceux obtenus avec la méthode des tubes multiples. Les dénombrements bactériens obtenus dans 67% des échantillons analysés par la méthode de filtration sur membrane ont été supérieurs à ceux obtenus par la méthode des tubes multiples. Cependant, une évaluation statistique des résultats n'avait montré des différences significatives entre les deux méthodes que dans un seul point de prélèvement, pour les concentrations de streptocoques fécaux.

Bien que la méthode de filtration sur membrane et la méthode des tubes multiples pour le dénombrement des coliformes totaux des coliformes fécaux et des streptocoques fécaux ne donnent

pas toujours les mêmes résultats, les deux méthodes donnent en substance la même information.

Comme résultat des discussions qui se sont tenues au sujet de l'exercice interlaboratoire et des rapports préparés par les différents laboratoires, les participants à la réunion se sont mis d'accord sur un résumé des modifications essentielles qui devaient être incorporées aux textes des quatre Méthodes de Référence considérées pendant l'exercice. Ces modifications, qui figurent dans l'annexe 10 du rapport de la réunion de Rome (OMS/PNUE, 1983), avait trait aux milieux de culture, aux conditions d'incubation et à l'identification des colonies. Les participants ont exprimé leur confiance qu'une application stricte de ces procédures analytiques améliorerait la fiabilité et la précision des résultats analytiques.

Exercice d'Interétalonnage en Commun

L'exercice a compris en principe la détermination des coliformes totaux, des coliformes fécaux et des streptocoques fécaux tant par la méthode de filtration sur membrane que par celle des tubes multiples. Cependant, vu le temps disponible pendant l'exercice, il a été décidé de limiter les analyses à la détermination des trois paramètres microbiens par la méthode de filtration sur membrane. Trois échantillons d'eau ont donc été analysés.

Les participants ont été divisés en six groupes de deux personnes chacun. Les résultats obtenus par les groupes individuels étaient en accord relatif, bien que l'hypothèse d'une différence statistiquement significative entre les participants pouvait être envisagée. De plus, une différence statistiquement significative pouvait être envisagée entre les deux estimations obtenues à partir de deux facteurs de dilution.

Cet exercice d'interétalonnage étant le premier organisé dans le cadre du MED POL, les résultats ont été jugés satisfaisants et l'expérience acquise considérée comme la base sur laquelle de futurs exercices d'interétalonnage pourraient être organisés. De plus, l'exercice a fourni une excellente occasion aux participants pour pouvoir comparer leurs techniques analytiques au cours du travail de laboratoire proprement dit et non simplement par de simples discussions.

Les paramètres statistiques de chacune des déterminations microbiologiques effectuées ont été estimés au moyen d'une distribution de probabilité normale logarithmique, graphiquement adaptée aux résultats expérimentaux. Ces paramètres sont résumés dans la table 4.

La table 4 montre que l'écart type des analyses de coliformes fécaux et de streptocoques fécaux sont voisins de 0,45 et 0,18 respectivement. Cela signifie que l'intervalle de confiance à 95% des analyses répétées varie entre 2,4 fois plus et 2,4 fois moins que la concentration moyenne des coliformes fécaux, et entre 1,4 fois plus et 1,4 fois moins que la concentration moyenne des streptocoques fécaux.

Table 4. Paramètres statistiques des distributions de probabilité normale logarithmique définies par les séries de résultats microbiologiques obtenus par la méthode de filtration sur membrane à l'exercice d'interétalonnage de Rome.

Echantillon d'eau de mer	Nombre d' analyses répétées	Coliformes fécaux		Streptocoques fécaux	
		Moyenne CF/100 ml	Ecart type	Moyenne CF/100 ml	Ecart type
A-1	6	$1,9 \cdot 10^5$	0,47	$4,7 \cdot 10^3$	0,18
B-1	6	3	0,76	5	0,18
C-1	6	10	0,41	10	0,13

Les analyses répétées sont donc bien plus précises que celles signalées par Villa et collaborateurs (OMS/PNUE, 1983) qui, caractérisées par un écart type logarithmique de 0,7-0,8, avaient un intervalle de confiance à 95% entre 4,4 fois plus et 4,4 fois moins que la valeur moyenne.

EXERCICE D'INTERETALONNAGE DE BARCELONE

L'exercice a compris la détermination des coliformes totaux, des coliformes fécaux et des streptocoques fécaux par la méthode de filtration sur membrane dans neuf échantillons d'eau de mer en utilisant les conditions d'incubation qui apparaissent dans la table 3. Les participants ont été divisés en sept groupes de trois personnes chacun.

Les paramètres statistiques de chacune des déterminations microbiennes effectuées ont été obtenus lors de l'exercice d'interétalonnage et sont résumés dans la table 5.

Un examen des résultats qui apparaissent dans la table 5 met en évidence une grande dispersion des concentrations bactériennes, avec des valeurs de l'écart type bien supérieures à celles obtenues lors de l'exercice d'interétalonnage qui s'est tenu à Rome et celui qui a été mené à bien en Catalogne au cours de l'été 1983 (OMS/PNUE, 1985a). Tandis que les écarts types obtenus pendant l'exercice de Rome se situaient dans l'intervalle 0,18-0,45, ceux obtenus en Catalogne par un seul analyste effectuant cinq analyses répétées de nombreux échantillons d'eau se trouvaient dans l'intervalle 0,08-0,11.

Les raisons suivantes ont été proposées pour expliquer les variations observées entre les résultats individuels obtenus à Barcelone (OMS/PNUE, 1985a):

1. Les différences de formation bactériologique des participants. Les résultats du premier au troisième jour ont montré que les participants s'adaptaient à la technique analytique utilisée.
2. Les fortes pluies enregistrées dans la région pendant l'exercice ont entraîné des apports terrestres vers les eaux côtières, qui ont considérablement augmenté leur charge bactérienne et leur contenu de matière en suspension. En raison de cette circonstance, il a fallu effectuer un grand nombre de dilutions, entraînant un plus grand risque d'erreur au moment de l'introduction de volumes d'eau représentatifs dans les flacons de dilution.

La variation considérable entre les résultats obtenus par les différents groupes de participants, mesurée par des écarts types proches ou supérieurs à 1,0, a montré combien il est essentiel d'effectuer soigneusement les opérations d'homogénéisation et de dilution nécessaires à l'analyse bactériologique de l'eau de mer.

Table 5. Paramètres statistiques des distributions de probabilité normale logarithmique définies par les séries de résultats microbiologiques obtenus par la méthode de filtration sur membrane à l'exercice d'interétalonnage de Barcelone.

Echantillon d'eau de mer	Nombre d' analyses répétées	Coliformes totaux		Coliformes fécaux		Streptocoques fécaux	
		Moyenne CT/100 ml	Ecart type	Moyenne CF/100 ml	Ecart type	Moyenne SF/100 ml	Ecart type
A-1	7	68 10 ⁵	1,88	2 10 ⁵	2,42	57 10 ³	0,89
B-1	7	13 10 ⁵	0,85	13 10 ⁵	0,25	32 10 ³	0,82
C-1	7	16 10 ⁴	1,59	35 10 ³	0,63	16 10 ³	0,59
A-2	7	89 10 ⁵	0,64	56 10 ⁴	0,84	32 10 ³	0,72
B-2	7	12 10 ⁵	0,60	11 10 ⁴	1,34	35 10 ²	0,50
C-2	7	16 10 ⁴	0,78	39 10 ³	0,57	18 10 ³	0,71
A-3	7	30 10 ⁴	0,92	63 10 ³	0,58	10 10 ³	0,56
B-3	7	17 10 ⁴	0,37	23 10 ³	0,80	50 10 ²	0,74
C-3	7	25 10 ⁴	0,36	20 10 ³	0,87	24 10 ²	1,22

EXERCICE D'INTERETALONNAGE D'ATHENES

L'exercice a compris la détermination des coliformes totaux par la méthode des tubes multiples et des coliformes fécaux et des streptocoques fécaux tant par la méthode de filtration sur membrane que par celle des tubes multiples. Deux échantillons d'eau de mer ont été analysés en utilisant les conditions d'incubation qui apparaissent dans la table 3. Les participants ont été divisés en cinq groupes de trois personnes chacun.

Les paramètres statistiques de chacune des déterminations microbiologiques effectuées ont été estimés au moyen d'une distribution de probabilité normale logarithmique, graphiquement adaptée aux résultats expérimentaux. Ces paramètres sont résumés dans la table 6.

La table 6 montre clairement que les écarts types des analyses effectués par la méthode des tubes multiples sont plus grands que ceux associés aux analyses effectuées par la méthode de filtration sur membrane.

L'intervalle de confiance à 95% pour les dénombrements bactériens obtenus par la méthode de filtration sur membrane peut être approximativement défini par 1,15 fois en dessus et en dessous de la valeur moyenne d'une série d'analyses répétées, ce qui représente en réalité un excellent niveau de précision. D'autre part, l'intervalle de confiance à 95% correspondant aux dénombrements obtenus par la méthode des tubes multiples peut être défini par 1,5 fois en dessus et en dessous de la valeur moyenne des analyses répétées, ce qui est encore un niveau de précision très acceptable.

Ces résultats corroborent la conclusion selon laquelle la méthode de filtration sur membrane fournit des résultats plus précis que la méthode des tubes multiples. Cependant, la vérification continue et détaillée qui a eu lieu pendant l'exercice, sur les procédures d'analyse et de dénombrement suivies par chaque participant, a donné sans aucun doute d'excellents niveaux de précision pour les deux méthodes d'analyse.

La vérification d'hypothèse qui apparaît dans la table 6 montre que la concentration moyenne estimée pour les coliformes fécaux dans l'échantillon A par la méthode de filtration sur membrane est significativement plus grande que celle estimée par la méthode des tubes multiples.

Au contraire, il n'y a pas de différence statistiquement significative entre les concentrations moyennes de streptocoques fécaux obtenues par les deux méthodes d'analyse dans l'échantillon d'eau de mer A.

Les concentrations microbiennes dans l'échantillon d'eau de mer B étaient trop petites pour permettre une comparaison fiable entre les méthodes analytiques.

Finalement, la plupart des participants ont recommandé que l'identification des coliformes fécaux par la méthode des tubes multiples soient basée sur leur capacité d'utiliser le lactose et de croître à 44,5°C.

Table 6. Paramètres statistiques et vérification d'hypothèse des distributions de probabilité normale logarithmique définies par les séries de résultats microbiologiques obtenus à l'exercice d'interétalonnage d'Athènes.

Méthode analytique	Nombre d'analyses répétées	Coliformes fécaux		Streptocoques fécaux	
		Moyenne CF/100 ml	Ecart type	Moyenne SF/100 ml	Ecart type
Filtration sur membrane	5 de l'échantillon A	38 10 ³	0,05	26 10 ³	0,08
Tubes multiples	5 de l'échantillon A	22 10 ³	0,16	27 10 ³	0,23
Vérification d'hypothèse (niveau de signification du 5%)					
Echantillon A		FM supérieure à NPP		Pas de différence	

Puisque la condition de produire de l'indole n'est pas incluse dans l'analyse de routine par la méthode de filtration sur membrane, ce critère d'identification devrait être supprimé dans la méthode des tubes multiples.

EXERCICE D'INTERETALONNAGE DE TUNIS

L'exercice a compris la détermination des coliformes totaux, des coliformes fécaux et des streptocoques fécaux tant par la méthode de filtration sur membrane que par celle des tubes multiples. Trois échantillons d'eau de mer et un échantillon de bivalves ont été analysés utilisant les conditions d'incubation qui apparaissent dans la table 3. Les participants ont été divisés en huit groupes de trois personnes chacun.

Les paramètres statistiques de chacune des déterminations microbiennes effectuées ont été estimés au moyen d'une distribution de probabilité normale logarithmique graphiquement adaptée aux résultats expérimentaux. Ces paramètres sont résumés dans la table 7. Les résultats des analyses de bivalves étaient tous situés au dessus de la limite normale de détection de la méthode, 2400 coliformes fécaux par 100 g, ce qui n'a pas permis leur évaluation statistique.

La table 7 ne montre pas de façon évidente le niveau relatif de précision de la méthode de filtration sur membrane et de la méthode des tubes multiples. Dans les échantillons A et B, la méthode de filtration sur membrane a un écart type plus petit pour les coliformes totaux et les coliformes fécaux, et donc un niveau de précision plus grand, que la méthode des tubes multiples. Des résultats contraires ont été obtenus dans l'échantillon C, et dans toutes les analyses de streptocoques fécaux des trois échantillons d'eau.

La vérification d'hypothèse qui apparaît dans la table 7 montre que, pour l'échantillon A, la concentration estimée par la méthode des tubes multiples pour les trois indicateurs microbiens est significativement plus grande que celle estimée par la méthode de filtration sur membrane. Il se passe exactement l'inverse pour les échantillons d'eau de mer B et C.

Si on tient compte de l'influence restreinte que la procédure de dilution peut avoir eue dans l'analyse des échantillons B et C, en raison de leurs concentrations microbiennes relativement faibles, on pourrait conclure que la méthode de filtration sur membrane ne fournit pas de concentrations microbiennes significativement plus faibles que la méthode des tubes multiples, dans des échantillons qui ont une pollution microbienne basse ou moyenne.

Bien que la méthode des tubes multiples ait fourni des résultats significativement plus grands que la méthode de filtration sur membrane pour l'échantillon d'eau de mer avec une pollution microbienne considé-

Table 7. Paramètres statistiques et vérification d'hypothèse des distributions de probabilité normale logarithmique définies par les séries de résultats microbiologiques obtenus à l'exercice d'interétalonnage de Tunis.

Méthode analytique	Nombre d'analyses répétées	Coliformes totaux		Coliformes fécaux		Streptocoques fécaux	
		Moyenne CT/100 ml	Ecart type	Moyenne CF/100 ml	Ecart type	Moyenne SF/100 ml	Ecart type
Filtration sur membrane	8 de l'échantillon A	2200	0,31	480	0,32	150	0,85
Tubes multiples	23 de l'échantillon A	3200	0,67	1700	0,62	330	0,38
Filtration sur membrane	8 de l'échantillon B	780	0,15	96	0,36	13	0,89
Tubes multiples	23 de l'échantillon B	140	0,30	50	0,35	4	0,23
Filtration sur membrane	8 de l'échantillon C	30	0,94	3	1,22	2	1,20
Tubes multiples	23 de l'échantillon C	17	0,19	5	0,40	2	0

Vérification d'hypothèse (niveau de signification du 5%)

Echantillon A	NPP supérieure à FM	NPP supérieure à FM	NPP supérieure à FM
Echantillon B	FM supérieure à NPP	FM supérieure à NPP	FM supérieure à NPP
Echantillon C	pas de différence	pas de différence	pas de différence

rable, les écarts types relativement élevés observés dans ce cas ne permettent pas d'arriver à une conclusion définitive.

EXERCICE D'INTERETALONNAGE DE SPLIT

L'exercice a compris la détermination de coliformes totaux, des coliformes fécaux et des streptocoques fécaux par la méthode de filtration sur membrane et des coliformes fécaux par la méthode des tubes multiples. Trois échantillons d'eau de mer et un échantillon de bivalves ont été analysés en utilisant les conditions d'incubation qui apparaissent dans la table 3. Les participants ont été divisés en sept groupes de deux personnes chacun.

Les paramètres statistiques de chacune des déterminations microbiennes effectuées ont été estimés par une distribution de probabilité normale logarithmique, graphiquement adaptée aux résultats expérimentaux. Ces paramètres sont résumés dans la table 8. Les résultats des analyses par la méthode des tubes multiples, tant des échantillons d'eau de mer que de l'échantillon de bivalves, ont été en dessus de la limite normale de détection de la méthode, 2400 colonies par 100 ml, et par conséquent n'ont pas permis leur évaluation et leur comparaison postérieure avec les résultats de l'autre méthode.

La table 8 n'indique pas de façon évidente le degré de précision de la méthode de filtration sur membrane. L'écart type des trois indicateurs microbiens dans les échantillons A et C sont compris dans l'intervalle de 0,12 à 0,14, ce qui peut être considéré comme un degré de précision relativement satisfaisant. Cependant, l'écart type des trois indicateurs microbiens dans l'échantillon B varie de 0,47 à 1,12, ce qui représente des valeurs bien plus grandes que celles obtenues dans les deux autres échantillons et indiquent donc un degré de précision insatisfaisant.

Les raisons de cette différence sont certainement dues à la procédure de dilution nécessaire pour ramener les dénombrements des colonies aux intervalles recommandés. Le niveau de pollution exceptionnellement élevé des échantillons peut avoir contribué à faire de la procédure de dilution l'élément critique de la méthode d'analyse.

Ce haut niveau de pollution a également donné lieu à une lecture positive de tous les tubesensemencés et n'a donc pas permis de faire une étude comparative des deux méthodes d'analyse microbiologique.

Table 8. Paramètres statistiques des distributions de probabilité normale logarithmique définies par les séries de résultats microbiologiques obtenus pas la méthode de filtration sur membrane à l'exercice d'interétalonnage de Split.

Echantillon d'eau de mer	Nombre d' analyses répétées	Coliformes totaux		Coliformes fécaux		Streptocoques fécaux	
		Moyenne CT/100 ml	Ecart type	Moyenne CF/100 ml	Ecart type	Moyenne SF/100 ml	Ecart type
A	7	-	-	14 10 ⁷	0,18	28 10 ⁶	0,12
B	7	33 10 ⁵	0,83	30 10 ⁵	1,12	54 10 ⁴	0,47
C	7	60 10 ²	0,40	28 10 ²	0,27	18 10 ²	0,23

EXERCICE D'INTERETALONNAGE DE MARSEILLE

L'exercice a compris la détermination des coliformes fécaux et des streptocoques fécaux dans deux échantillons d'eau de mer tant par la méthode de filtration sur membrane que par celle des tubes multiples. Les coliformes fécaux d'un échantillon de bivalves ont été aussi déterminés par la méthode des tubes multiples. Les conditions d'incubation utilisées apparaissent dans la table 3. Les participants ont travaillé individuellement.

Les paramètres statistiques de chacune des déterminations microbiennes effectuées ont été estimés par une distribution de probabilité normale logarithmique, graphiquement adaptée aux résultats expérimentaux. Ces paramètres sont résumés dans la table 9.

La table 9 montre que les écarts types des analyses d'eau de mer effectuées par la méthode de filtration sur membrane sont généralement plus petits que ceux des analyses effectuées par la méthode des tubes multiples. Par conséquent, la méthode des tubes multiples donnerait des concentrations microbiennes moins précises que la méthode de filtration sur membrane. Globalement, la précision des deux méthodes peut être tenue pour satisfaisante, en tenant compte que les écarts types varient de 0,16 à 0,39.

L'adoption de critères communs pour le dénombrement des colonies développées sur les membranes et pour l'interprétation des tubes positifs paraît être un des éléments essentiellement responsables des niveaux de précision observés.

La table 9 montre aussi que l'écart type des analyses de coliformes fécaux effectuées dans des bivalves par la méthode des tubes multiples est considérablement large, indiquant que cette méthode d'analyse a une précision relativement faible. Pour illustrer cette observation, l'intervalle de confiance à 95% des concentrations de coliformes fécaux peut être estimé par les valeurs de 0,6 et 820 CF/100 g de chair. Finalement, il faut signaler l'excellent accord entre les résultats expérimentaux des analyses des bivalves et la ligne droite qui représente la distribution normale logarithmique correspondante.

La vérification d'hypothèse qui apparaît dans la table 9 indique que, pour des concentrations moyennes en dessous de 100 colonies/100 ml, la méthode de filtration sur membrane donne des valeurs significativement plus grandes que la méthode des tubes multiples dans deux cas, tandis que la méthode des tubes multiples donne une valeur significativement plus grande que la méthode de filtration sur membrane dans un cas. Dans un troisième cas, il n'y a pas de différence significative entre les deux méthodes.

En tenant compte de l'intervalle des concentrations microbiennes moyennes observé, on pourrait conclure que les deux méthodes d'analyse donnent une estimation équivalente du contenu microbien d'un échantillon d'eau de mer.

Table 9. Paramètres statistiques et vérification d'hypothèse des distributions de probabilité normale logarithmique définies par les séries de résultats microbiologiques obtenus à l'exercice d'interétalonnage de Marseille.

Méthode analytique	Nombre d'analyses répétées	Coliformes fécaux		Streptocoques Fécaux	
		Moyenne CF/100 ml	Ecart type	Moyenne SF/100 ml	Ecart type
Filtration sur membrane	18 de l'échantillon A	20	0,20	7	0,32
Tubes multiples	18 de l'échantillon A	40	0,26	7	0,29
Filtration sur membrane	18 de l'échantillon B	25	0,17	55	0,16
Tubes multiples	18 de l'échantillon B	10	0,30	22	0,39
Tubes multiples	18 de chair de bivalves	22 (*)	0,80	-	-

Vérification d'hypothèse (niveau de signification du 5%)			
Echantillon A	NPP supérieure à FM	Pas de différence	
Echantillon B	FM supérieure à NPP	FM supérieure à NPP	

(*) Exprimé en CF/100 g de chair

DETERMINATION DES STREPTOCOQUES FECAUX

Les études menées à bien et l'expérience acquise par les scientifiques méditerranéens sur la sélection des milieux de culture les plus adéquats pour les streptocoques fécaux montrent clairement les résultats du travail réalisé pendant le Projet MED POL VII et, en particulier, au cours des exercices d'interétalonnage organisés dans le cadre du MED POL Phase II.

La procédure recommandée pour la détermination des streptocoques fécaux a été initialement définie dans les Directrices pour la surveillance continue de la qualité sanitaire des eaux côtières (OMS/PNUE, 1977). Les objectifs principaux des Directrices ont été de sélectionner et d'harmoniser les procédures et les méthodes analytiques et contribuer de cette façon à une surveillance meilleure et plus efficace des plages, des eaux de mer et des eaux conchylicoles. La détermination des streptocoques fécaux a été basée sur la croissance de colonies rouges à roses sur la gélose KF-Streptococcus après 48 heures à 44°C.

Pour des raisons inconnues, le milieu de culture fourni par l'OMS/PNUE aux laboratoires méditerranéens participant au Projet MED POL VII a été la gélose M-Enterococcus. Par conséquent, les analyses de streptocoques fécaux inclus dans le programme de surveillance continue des eaux côtières à des fins de plaisance et des eaux conchylicoles dans la Méditerranée ont été effectuées par incubation sur la gélose M-Enterococcus à 37°C.

Les résultats préliminaires des chercheurs principaux du Projet MED POL VII ont indiqué que l'utilisation de la gélose KF-Streptococcus donne des dénombrements plus élevés que la gélose M-Enterococcus et que le milieu KF est donc supérieur au milieu M-Enterococcus (OMS/PNUE, 1983). Par ailleurs, des études réalisées par des laboratoires méditerranéens ont indiqué que les dénombrements obtenus à 35°C sur la gélose KF-Streptococcus étaient considérablement plus élevés que ceux obtenus à 44°C (Yoshpe-Purer, OMS/PNUE, 1983), et une étude comparative sur la méthode de filtration sur membrane (Havelaar et Engel, 1981) a également indiqué que la proportion entre les dénombrements obtenus à 37°C et ceux obtenus à 44°C variait entre 0,9 et 2,5.

Une température d'incubation de 36°C sur la gélose KF-Streptococcus a donc été incorporée dans les résumés des modifications à faire dans les Méthodes de Référence recommandées par l'OMS/PNUE (1983).

Cependant, un inconvénient évident de la gélose KF-Streptococcus a également été signalé, puisque entre 10 et 30% des colonies confirmées par un laboratoire n'étaient pas des streptocoques (Yoshpe-Purer, OMS/PNUE, 1983), et puisque la confirmation des petites colonies qui apparaissent fréquemment en très grand nombre ne révèle la présence de streptocoques du groupe D que dans une proportion variable, et parfois même faible (Havelaar et Engel, 1981).

Pendant la mise en oeuvre du MED POL Phase II, il est apparu évident que les concentrations de streptocoques fécaux dans les eaux de la Méditerranée n'étaient pas correctement évaluées par l'incubation sur la gélose KF-Streptococcus. Au cours de l'Exercice d'interétalonnage de Marseille, des participants ont signalé que la gélose KF n'était pas un milieu assez sélectif pour la détection des streptocoques fécaux, et qu'elle donnait des résultats faux positifs. La gélose M-Enterococcus a été considérée comme un milieu plus satisfaisant, bien qu'elle puisse donner lieu à des résultats faux négatifs (OMS/PNUE, 1986).

En tenant compte que les résultats des analyses effectuées par la méthode des tubes multiples, en utilisant les bouillons de Rothe et de Litsky, et par la méthode de filtration sur membrane, en utilisant la gélose M-Enterococcus, n'ont pas montré une différence statistiquement significative entre les deux (Feliú, OMS/PNUE, 1983), et que les analyses sur la gélose KF-Streptococcus peuvent donner lieu à un nombre considérable de colonies fausses négatives, on peut s'attendre à ce que l'évaluation microbiologique des eaux côtières au moyen de la gélose KF-Streptococcus puisse être influencée par des interférences inutiles en relation avec l'évaluation obtenue au moyen de la méthode des tubes multiples.

Le besoin d'assurer la comparabilité des résultats obtenus par différents laboratoires, et les implications pratiques que des concentrations microbiennes différentes peuvent avoir au moment d'évaluer la qualité des eaux côtières avec les critères et les normes microbiologiques actuels, montrent clairement qu'une étude comparative de la méthode des tubes multiples, en utilisant les bouillons de Rothe et de Litsky, et de la méthode de filtration sur membrane, en utilisant les géloses KF-Streptococcus et M-Enterococcus, devrait être menée à bien dans la région méditerranéenne dans les délais les plus brefs.

CONCLUSIONS

L'objectif général de cette étude a été d'examiner et d'évaluer les résultats expérimentaux obtenus et les conclusions atteintes pendant la série de six exercices d'interétalonnage sur les méthodes microbiologiques pour la surveillance continue de la qualité des eaux côtières, qui se sont tenus dans la région méditerranéenne de 1982 à 1985.

L'analyse et la discussion réalisées permettent de formuler les conclusions suivantes:

1. Les exercices d'interétalonnage ont offert une excellente occasion, sans précédent à niveau régional dans la Méditerranée, d'évaluer les facteurs qui exercent une influence sur la fiabilité et la précision des méthodes analytiques pour l'évaluation microbiologique des eaux côtières.
2. Des fluctuations imprévues de la qualité des eaux côtières, causées en particulier par des déversements d'origine terrestre provoqués par de fortes pluies, ont donné lieu à des concentrations microbiennes et de matière en suspension anormalement élevées. Ces circonstances ont fait que les résultats expérimentaux ont dépassé les limites de détection adoptées pour les analyses et ont causé une plus grande source d'erreur analytique au moment de transférer des volumes représentatifs d'échantillon dans les flacons de dilution.
3. Les composantes analytiques qui ont besoin d'être spécifiées et normalisées davantage sont les suivantes: la procédure de dilution de l'échantillon, les milieux de culture, les critères d'identification et de dénombrement tant des colonies bactériennes que des tubes positifs, et les procédures statistiques essentielles pour l'interprétation des résultats expérimentaux.
4. Il est absolument essentiel que l'analyse microbiologique des eaux côtières et des bivalves soit faite en accord total avec les méthodes recommandées. Il faut signaler qu'une méthode d'analyse n'est pas seulement définie par le principe technique utilisé pour détecter la croissance des bactéries, la membrane filtrante ou les tubes multiples, mais également par une série d'éléments qui vont de la préparation et la dilution de l'échantillon à l'identification et au dénombrement des colonies ou des tubes positifs.
5. La méthode de filtration sur membrane donne des résultats plus précis que la méthode des tubes multiples. La dilution de l'échantillon avant l'analyse, et l'identification et le dénombrement des colonies ou des tubes positifs, sont les deux facteurs qui exercent une plus grande influence sur la précision des deux méthodes microbiologiques, et en particulier sur celle de la méthode de filtration sur membrane.

6. Une dilution soigneuse de l'échantillon, et une interprétation et un dénombrement normalisés des colonies, lors des analyses répétées par la méthode de filtration sur membrane, peuvent donner des concentrations microbiennes dont l'intervalle de confiance à 95% est défini par 1,15 fois en dessus et en dessous de leur valeur moyenne. Cela représente un excellent niveau de précision. L'utilisation de la méthode des tubes multiples dans des conditions expérimentales similaires peut donner un intervalle de confiance à 95% dont le facteur multiplicateur est 1,5.
7. Une procédure de dilution erronée, et une interprétation et un dénombrement incohérents des colonies ou des tubes positifs ont donné lieu à des niveaux de précision très bas pour les deux méthodes d'analyse, avec des intervalles de confiance à 95% définies par plus d'un ordre de grandeur en dessus et en dessous de la concentration microbienne moyenne.
8. Les milieux de culture utilisés ont une grande influence sur les concentrations microbiennes obtenues tant par la méthode de filtration sur membrane que celle des tubes multiples. L'utilisation du bouillon lactosé s'est révélée comme la méthode la plus efficace pour récupérer les bactéries coliformes. La suppression du test de l'indole lors de la détermination des coliformes fécaux rendrait les critères différentiels de la méthode des tubes multiples équivalents à ceux de la méthode de filtration sur membrane.
9. La gélose KF-Streptococcus utilisée pour la détermination des streptocoques fécaux par la méthode de filtration sur membrane donne un nombre considérable de colonies fausses positives, et elle introduit donc une interférence positive dans les analyses effectuées avec cette méthode. Bien que l'on accepte généralement qu'il n'existe pas un milieu de culture avec un caractère sélectif satisfaisant pour ces micro-organismes, la gélose M-Enterococcus devrait être considérée comme un meilleur choix, même si elle peut sous-estimer le nombre de micro-organismes.
10. La méthode de filtration sur membrane et la méthode des tubes multiples adoptées lors de ces exercices donnent des résultats comparables quand on analyse les coliformes totaux et les coliformes fécaux. Cependant, sur un total de 9 analyses comparatives, la méthode de filtration sur membrane a donné des concentrations significativement plus élevées que la méthode des tubes multiples dans 4 cas, tandis qu'il n'y a pas eu de différence significative entre les concentrations obtenues par les deux méthodes dans deux autres cas.
11. Les interférences analytiques introduites par la dilution des échantillons et l'interprétation et le dénombrement des colonies ou des tubes positifs semblent être responsables des contradictions observées dans l'étude comparative des deux méthodes microbiologiques.

12. Il n'y a pas eu de différence significative entre les concentrations de streptocoques fécaux obtenues dans un seul échantillon d'eau de mer, analysé par la méthode des tubes multiples et la méthode de filtration sur membrane, avec la gélose KF-Streptococcus. Cependant, il est bien évident tant dans la Méditerranée comme ailleurs, que la gélose KF-Streptococcus donne des concentrations significativement plus élevées que la méthode des tubes multiples, avec les bouillons de Rothe et de Litsky.
13. La méthode de filtration sur membrane et la méthode des tubes multiples donnent des concentrations comparables de streptocoques fécaux pour l'analyse des échantillons d'eau de mer, quand on utilise la gélose M-Enterococcus et les bouillons de Rothe et de Litsky. Sur un total de 5 analyses comparatives, la méthode de filtration sur membrane a donné des concentrations significativement plus élevées que la méthode des tubes multiples dans 2 cas, tandis qu'il n'y a pas eu de différence significative entre les concentrations obtenues par les deux méthodes dans 2 autres cas.
14. L'interprétation objective des résultats microbiologiques a encore besoin d'une mise en oeuvre complète dans beaucoup de laboratoires méditerranéens. L'utilisation systématique des principes statistiques fondamentaux, comme ceux que propose la Méthode de Référence OMS/PNUE qui paraîtra sous peu, aurait beaucoup aidé les laboratoires participants à évaluer leurs résultats expérimentaux et à interpréter les facteurs qui déterminent la précision de leurs méthodes analytiques.
15. Les valeurs numériques obtenues pour les paramètres statistiques associés aux méthodes microbiologiques utilisées dans ces exercices donnent une indication quantitative et claire des niveaux de précision qui peuvent être atteints dans différentes conditions expérimentales. Cette information devrait largement contribuer à une meilleure compréhension des facteurs qui déterminent la précision de la méthode dans chaque cas particulier et, par conséquent, à obtenir un meilleur contrôle de qualité des analyses microbiologiques.
16. En résumé, la détermination analytique des indicateurs microbiens pour la surveillance continue de la qualité des eaux côtières a besoin d'être normalisée davantage et soumise à un programme continu de contrôle de qualité, afin d'assurer que les résultats obtenus par différents analystes soient fiables et comparables.

RECOMMANDATIONS

Les résultats et les conclusions obtenus pendant cette étude permettent de formuler les recommandations suivantes:

1. L'interétalonnage des méthodes analytiques pour les indicateurs microbiens devrait être poursuivi, afin d'assurer la comparabilité des résultats. Cependant, la planification et la réalisation des prochains exercices d'interétalonnage devraient se faire de manière à éviter les conséquences de la présence imprévue de niveaux élevés de micro-organismes et de matière en suspension, et à assurer un nombre statistiquement satisfaisant d'échantillons répétés.

En particulier, et afin d'assurer la comparabilité des concentrations de streptocoques fécaux obtenues par la méthode de filtration sur membrane et la méthode des tubes multiples, une étude comparative de la gélose KF-Streptococcus en relation avec les bouillons de Rothe et de Litsky et la gélose M-Enterococcus, devrait être effectuée dans les plus brefs délais.

Les implications pratiques de ces résultats au moment de l'évaluation de la qualité des eaux côtières par les critères et les normes actuels de qualité ambientale confèrent à cette étude particulière la plus grande importance.

2. Un effort devrait être fait pour mener à bien un exercice d'interétalonnage au cours duquel des échantillons identiques d'eau de mer seraient envoyés aux laboratoires participants pendant au moins une année. Cette approche permettrait d'obtenir un grand nombre de résultats de chaque laboratoire et de s'assurer que les déterminations analytiques sont effectuées dans les conditions expérimentales propres à chaque laboratoire.

L'expérience obtenue pendant des exercices d'interétalonnage similaires, menés à bien avec succès dans de petites zones de la Méditerranée, pourrait contribuer en grande mesure à l'implantation de ce type d'exercice à un niveau régional dans la Méditerranée.

3. Des études comparatives des méthodes analytiques pour les indicateurs microbiens devraient être fondées préférentiellement sur des comparaisons entre séries chronologiques de résultats obtenus pour un point de prélèvement donné, au lieu de comparaisons entre analyses répétées des échantillons d'eau obtenus dans des points de prélèvement différents. Cette approche devrait permettre une évaluation de la comparabilité des méthodes analytiques pour déterminer la qualité d'un point de prélèvement, ce qui est un des objectifs fondamentaux du programme de contrôle de la qualité des eaux côtières inclus dans le MED POL Phase II.

4. Les Méthodes de Référence actuelles pour la détermination analytique des indicateurs microbiens devraient incorporer les modifications recommandées lors de cette série d'exercices d'interétalonnage. Les nouveaux textes devraient être largement distribués, afin d'assurer que les laboratoires méditerranéens bénéficient de cette expérience régionale et effectuent les analyses de façon normalisée et identique.

La révision et la mise à jour des Méthodes de Référence devraient être faites périodiquement, afin d'assurer un avancement efficace et continu de la méthodologie proposée.

5. La Méthode de Référence qui doit paraître prochainement sur l'évaluation statistique des données microbiologiques représente un outil statistique fondamental pour le contrôle de qualité des laboratoires microbiologiques, et par conséquent devrait être disponible le plus rapidement possible.

Le contenu de cette Méthode de Référence, ainsi que le matériel inclus dans ce rapport sommaire et les résultats des programmes de surveillance continue qui sont menés à bien par les laboratoires méditerranéens, pourraient constituer les principaux sujets de discussion lors d'une session de formation de microbiologistes méditerranéens, qui devrait être organisée afin de développer leur capacité d'évaluation des données et de contrôle de qualité.

6. Une formation additionnelle des microbiologistes méditerranéens devrait être menée à bien afin d'assurer que les méthodes analytiques soient correctement comprises et strictement appliquées, en particulier lors de la dilution des échantillons, l'identification et le dénombrement des colonies ou des tubes positifs, et le calcul des résultats.

Ces réunions de formation, organisées dans le cadre de la composante d'assistance du MED POL Phase II, fourniraient une excellente occasion de discuter les aspects techniques du contrôle de qualité et les comparaisons des résultats microbiologiques, ainsi que de réviser et mettre à jour les Méthodes de Référence pour l'analyse microbiologique.

REFERENCES

- Gibra, I.N. (1973). Probability and Statistical Inference for Scientists and Engineers. Prentice Hall, Inc.
- Havelar, A.H. et H.W.B. Engel (1981). Comparative study of membrane filtration methods for the isolation of group D streptococci from water. Water Research, vol.15, pp.191 à 197.
- NU (1978). Mediterranean Action Plan. United Nations Environment Programme. Geneva.
- OMS/PNUE (1977). Guidelines for Health Related Monitoring of Coastal Water Quality. World Health Organization, Copenhagen.
- OMS/PNUE (1981). Coastal Water Quality Control in the Mediterranean. Final report of the Joint WHO/UNEP Coordinated Pilot Project (MED VII) (1976-1980). World Health Organization, Copenhagen.
- OMS/PNUE (1983). Methods for Monitoring Selected Pollutants in Sewage Effluents and Coastal Recreational Waters. Report on a joint WHO/UNEP meeting in Rome. World Health Organization, Copenhagen.
- OMS/PNUE (1984). Microbiological Methods for Coastal Water Quality Monitoring. Report on a joint WHO/UNEP meeting in Athens. World Health Organization, Copenhagen.
- OMS/PNUE (1985a). Microbiological Methods for Coastal Water Quality Monitoring. Report on a joint WHO/UNEP meeting in Barcelona. World Health Organization, Copenhagen.
- OMS/PNUE (1985b). Les méthodes microbiologiques de surveillance de la qualité des eaux côtières. Rapport sur une réunion mixte OMS/PNUE à Tunis. Organisation Mondiale de la Santé, Copenhague.
- OMS/PNUE (1985c). Microbiological Methods for Coastal Water Quality Monitoring. Report on a joint WHO/UNEP meeting in Split. World Health Organization, Copenhagen.
- OMS/PNUE (1986) (sous presse). Microbiological Methods for Coastal Water Quality Monitoring. Report on a joint WHO/UNEP meeting in Marseille. World Health Organization, Copenhagen.
- PNUE (1983a). Co-ordinated Mediterranean Pollution Monitoring and Research Programme (MED POL)-Phase I: Programme Description. UNEP Regional Seas Reports and Studies No.23.
- PNUE (1983b). Long-term Programme for Pollution Monitoring and Research in the Mediterranean (MED POL) Phase II. UNEP Regional Seas Reports and Studies No. 28.